第40卷 第4期
2023年4月

干 旱 区 研 究
ARID ZONE RESEARCH

Vol. 40 No. 4
Apr. 2023

松叶猪毛菜叶片原生质体的制备及优化

席昱欣[1,2,3]， 张玉慧[1,3,4]， 闻志彬[1,2,4,5]

(1. 中国科学院新疆生态与地理研究所,荒漠与绿洲生态国家重点实验室,新疆 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆抗逆植物基因资源保育与利用重点实验室,新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 中国科学院大学,北京 100049;
4. 中国-塔吉克斯坦生物资源保育与利用联合实验室,新疆 乌鲁木齐 830011;
5. 中国科学院新疆生态与地理研究所标本馆,新疆 乌鲁木齐 830011)

摘 要: 从植物组织中释放出高质量的原生质体是建立其他技术体系如蛋白亚细胞定位、瞬时表达分析、蛋白质间互作的前提。为了快速挖掘C_3-C_4中间型植物松叶猪毛菜(*Salsola laricifolia*)的特殊功能基因,建立一个简单高效的叶片原生体的制备方法必不可少。本研究以松叶猪毛菜无菌组培苗的真叶为材料,分析不同纤维素酶和离析酶的浓度配比、渗透压对原生质体分离的影响。结果表明:采用25 d龄的无菌组培苗真叶,在2%纤维素酶+0.5%离析酶+0.6 $mol \cdot L^{-1}$甘露醇的酶解液中25 ℃酶解2 h,使用W5溶液在800 $rpm \cdot min^{-1}$的转速下纯化,原生质体产量可达1.21×10^6个,活力为85%。并且利用得到的松叶猪毛菜原生质体作为受体,用PEG转化法成功转化pBI121-*SaNADP-ME4-GFP*质粒载体,检测到*SaNADP-ME4*定位于叶绿体中。本项研究建立了松叶猪毛菜叶片原生质体高效制备体系,为松叶猪毛菜特殊基因功能的挖掘奠定了基础。

关键词: 松叶猪毛菜(*Salsola laricifolia*); 叶片; 原生质体; C_3-C_4中间型植物

植物原生质体是植物细胞去除细胞壁以外各种结构的总称,并且能够进行一定的生命活动[1]。原生质体由于失去了细胞壁的保护,可摄取DNA、质粒、病毒等外源物质[2],实现外源基因功能、蛋白亚细胞定位以及蛋白质-蛋白质相互作用等方面研究[3-5],是植物分子遗传和植物育种领域理想的实验材料。获得植物原生质体的方法有机械法和酶解法,其中,酶解法是目前应用最多最广泛的分离方法。将植物材料置于能溶解细胞壁的酶解液中,待细胞壁溶解后释放出原生质体[6]。通过前人不断优化实验条件,模式植物如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)[7-8]、烟草(*Nicotiana tabacum*)[9-10]、水稻(*Oryza sativa*)[11]的原生质体制备技术、转化及再生体系已较为完备并得到广泛应用,非模式植物如非洲菊(*Gerbera hybrida*)[12]、黑麦草(*Lolium perenne*)[13]、苋菜(*Amaranthus tricolor*)[14]、山茶花(*Camellia sinensis*)[15]、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)[16]、油棕(*Elaeis guineensis*)[17]、葡萄(*Vitis vinifera*)[18]、甜樱桃(*Prunus avium*)[19]的制备与转化体系也不断发展。虽然,模式植物如拟南芥、烟草的制备及转化体系已经十分完备且方便易得,但由于遗传背景不同,基因在模式植物中异源表达可能与其在本底植物中的表达存在差异[20]。植物原生质体分离的原理虽相似,但目前并没有一种通用的原生质体制备及转化体系,仅有研究者建立了适用于被子植物花器官和果实的原生质体制备和转化体系[21]。因此,建立不同物种的原生质体制备及转化体系对于自身基因功能的验证及挖掘具有重要的意义。

松叶猪毛菜(*Salsola laricifolia*)隶属藜科猪毛菜族,小灌木,主要分布于蒙古、苏联、中亚地区及中国[22],广泛分布于砾质山坡和砾质荒漠[23]。基于松叶猪毛菜的解剖结构、超微结构及酶活性等指标,确定松叶猪毛菜为C_3-C_4中间型植物(C_3到C_4途径进化的中间类型)[24-26]。研究C_3-C_4中间型植物的解剖结构、生理生化特性和特殊功能基因,有助于探究C_4植物的高光效机制以及进化意义。因此,松叶猪

收稿日期: 2022-07-07; **修订日期:** 2022-12-12
基金项目: 国家自然科学基金项目(31970354)
作者简介: 席昱欣(1999-),女,在读研究生,研究方向为植物抗逆分子生物学. E-mail: xiyuxin20@mails.ucas.ac.cn
通讯作者: 闻志彬. E-mail: zhibinwen@ms.xjb.ac.cn

毛菜作为典型的C_3-C_4中间型荒漠植物，建立完备的原生质体制备体系是建立其他技术体系（如蛋白亚细胞定位、瞬时表达分析、蛋白质间互作）的前提，这对于该物种特殊功能基因的挖掘以及进化意义的探索具有十分重要的意义。本研究以松叶猪毛菜无菌组培苗真叶为实验材料，对纤维素酶、离析酶、甘露醇浓度以及酶解时间4个因素进行正交实验，探究酶解液组成与酶解时间对原生质体制备的影响，并在此基础上利用PEG介导法验证松叶猪毛菜NADP−苹果酸酶基因4(*SaNADP-ME*4)的亚细胞定位。

1 材料与方法

1.1 植物材料

松叶猪毛菜种子于2020年10月采自北疆，4 ℃冰箱保存备用。种子用无菌水浸泡15 min，次氯酸钠溶液洗涤8 min，无菌水冲洗5次，75%酒精洗涤30 s，种衣剂福美双（称取1 g福美双溶于15~20 mL ddH_2O）洗涤30 s，直接播种于1/2 MS固体培养基上，在人工气候箱中萌发7 d(白天：25 ℃，14 h；夜晚：18 ℃，10 h；光照6000 Lux)，挑选长势好并且大小一致的幼苗移植入新的1/2 MS固体培养瓶中，人工气候箱其他条件不变，光照设为12000 Lux。

1.2 载体及试剂

过表达载体pBI121-*SaNADP-ME*4及pBI121-*GFP*空载的大肠菌株为本实验室保存，具有卡那霉素抗性基因和*GFP*报告基因。已有研究表明，*SaNADP-ME*4[27]编码一种646个氨基酸的蛋白质，前人利用拟南芥原生质体进行激光共聚焦成像发现该蛋白质定位于叶绿体中。纤维素酶Cellulase R−10、离析酶Macerozyme R−10、D−甘露醇、牛血清白蛋白（BSA）、质粒小提试剂盒Plasmid Mini Kit购自相关生物公司，其他试剂均为国产分析纯。

1.3 酶解液配制

酶解液成分为：4.265 g·L^{-1} MES、1.000 g·L^{-1} BSA、1.110 g·L^{-1} $CaCl_2$、甘露醇、纤维素酶R−10、离析酶R−10（纤维素酶、离析酶和甘露醇浓度配比如表1所示）。酶解液需现配现用，配置时甘露醇与MES溶解后于55 ℃水浴10 min，冷却至室温后加入BSA和$CaCl_2$，纤维素酶和离析酶最后加入，酶解液配置好后用0.22 μm无菌过滤器过滤除菌。

1.4 原生质体的分离

取100 mg松叶猪毛菜无菌组培苗真叶，在超净工作台里用无菌解剖刀将叶片从中间纵向剖开，置于0.7 mol·L^{-1}甘露醇溶液中质壁分离10 min，将叶片转移至1 mL酶解液（37 ℃水浴激活5 min）中，25 ℃避光酶解数小时（酶解时间如表1所示），取出后轻柔颠倒几次，充分释放出原生质体。

表1 原生质体分离的正交实验因素水平

Tab. 1 Orthogonal experiment factor level of protoplast isolation

编号	因素			
	纤维素酶浓度/%	离析酶浓度/%	甘露醇浓度/(mol·L^{-1})	酶解时间/h
1	1.0	0.50	0.4	2
2	2.0	0.75	0.5	3
3	3.0	1.0	0.6	4

1.5 原生质体的纯化

用W5溶液（成分为：0.900 g·L^{-1} 葡萄糖、9.000 g·L^{-1} NaCl、13.875 g·L^{-1} $CaCl_2$、0.370 g·L^{-1} KCl及0.853 g· L^{-1} MES；pH 5.8）提前润洗200目筛网，过滤酶解液，去除残余未分解的植物组织；向酶解过滤液中加入等体积的W5溶液终止酶解反应（剪去枪头尖端，并沿管壁缓慢环加），4 ℃下800 rpm·min^{-1}离心5 min；弃上清，加入500 μL W5溶液悬浮清洗底部原生质体；4 ℃下800 rpm·min^{-1}离心5 min；弃上清，加入200 μL W5溶液重悬底部原生质体（全程温和操作，避免剧烈摇动原生质体），即获得松叶猪毛菜原生质体悬浮液，置于4 ℃冰箱备用。

1.6 原生质体的活力测定及计数

利用伊文思蓝染色法测定原生质体活力：用剪去枪头尖端的移液器吸取50 μL原生质体悬浮液置于载玻片上，滴加20 μL 0.25%伊文思蓝染液，静置5 min后在光学显微镜下观察，检测原生质体活性。原生质体活力计算公式：原生质体活力=（视野内未被染色的原生质体数÷视野内原生质体总数）×100%。

采用血球计数法计算原生质体的产量：用乙醇溶液轻轻擦拭血球计数板，清水冲洗干净，滤纸擦干；用擦镜纸擦拭光学显微镜的物镜及目镜；将洁净的盖玻片盖在血球计数板中央计数区，用剪去枪头尖端的移液器吸取原生质体悬浮液滴加于盖玻片一侧，让其渗入计数室中，静置片刻待原生质体

悬浮液不再流动且完全沉降至血球计数室内,即可开始计数。25×16规格的血球计数板,取视野中的左上、左下、右上、右下及中央中方格为计数区域,每个中方格包含16个小方格,总计80个小方格。计数80个小方格内原生质体的数目,每组原生质体悬浮液进行3次计数。原生质体数目计算方法参照25×16规格血球计数板计算公式[28]。原生质体数目/100 mg=5个中方格内的原生质体数/80×400×10^4×稀释倍数。

1.7 原生质体分离正交实验

在前期预实验的基础上,采用正交实验设计四因素三水平,共计9组处理,每组处理3个重复,比较纤维素酶浓度、离析酶浓度、甘露醇浓度和酶解时间对松叶猪毛菜组培苗真叶原生质体分离产量和活力的影响(表1)。

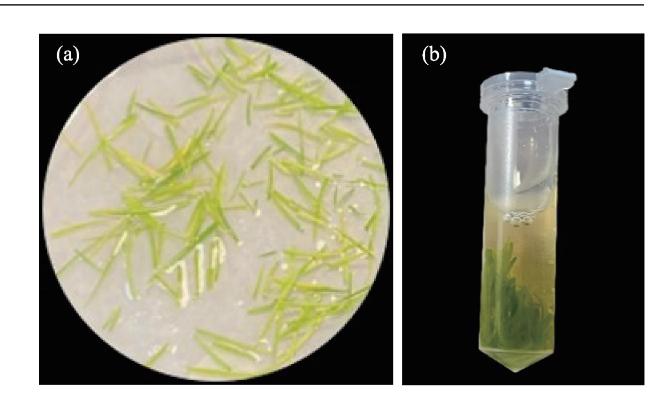
1.8 外源基因在原生质体中的转化

将制备好的原生质体溶液在4 ℃下800 rpm·min^{-1}离心5 min;弃上清,用1 mL MMG溶液(成分为:73.000 g·L^{-1}甘露醇、1.430 g·L^{-1} $MgCl_2$、0.853 g·L^{-1} MES;pH 5.8)重悬原生质体;利用广泛使用且高效的PEG介导法[29]进行转化:用剪去枪头尖端的移液器吸取100 μL的原生质体溶液于1.5 mL的离心管中,将10 μL pBI121-*SaNADP-ME4-GFP*质粒载体加入管底,轻弹管底混匀;再加入110 μL PEG溶液(成分为:400.000 g·L^{-1} PEG4000、36.500 g·L^{-1}甘露醇、11.100 g·L^{-1} $CaCl_2$;pH 5.8),缓慢倒置几次混匀;静置20 min完成转化;加入440 μL W5溶液混匀终止转化反应;800 rpm·min^{-1}离心3 min;弃上清,用1 mL WI溶液(成分为:73.000 g·L^{-1}甘露醇、0.853 g·L^{-1} MES、1.490 g·L^{-1} KCL;pH 5.8)重悬原生质体,室温黑暗过夜孵育;800 rpm·min^{-1}离心3 min,去除800 μL上清,浓缩原生质体溶液,取适量制片;以转化pBI121-*GFP*空载的原生质体做对照,于激光共聚焦扫描显微镜下观察*GFP*的表达情况。

2 结果与分析

2.1 松叶猪毛菜组培苗真叶原生质体的分离

收集移植在1/2 MS固体培养瓶中的松叶猪毛菜幼苗,每组处理称取100 mg幼苗真叶,将叶片从中间纵向剖开,置于0.7 mo·L^{-1}的甘露醇溶液中质壁分离10 min(图1a),将叶片转移到1 mL酶解液中酶解(图1b)。



注:(a)图为纵向剖开的真叶于0.7 mol·L^{-1}的甘露醇溶液中质壁分离;(b)图为纵向剖开的真叶于1 mL酶解液中。

图1 松叶猪毛菜真叶原生质体分离

Fig. 1 Protoplast isolation of *Salsola laricifolia*

2.2 酶解液组合、甘露醇浓度、酶解时间对原生质体产量、活力的影响

按照正交实验设计四因素三水平的9个实验组合,进行松叶猪毛菜真叶原生质体的分离,对产量及活力进行统计并对产量数据进行极差分析(表2)。对原生质体产量影响的结果显示,纤维素酶浓度的极差最高,表明实验设计的4个因素中,纤维素酶浓度对松叶猪毛菜真叶原生质体分离产量的影响最为显著。此外,甘露醇浓度的极差仅次于纤维素酶浓度,表明甘露醇浓度是松叶猪毛菜真叶原生质体分离产量的另一重要因素。酶解时间及离析酶浓度的极差较小,表明在该实验设计的四个因素的三个水平下,二者对原生质体分离产量的影响小于纤维素酶和甘露醇浓度造成的影响。对原生质体活力影响的结果显示酶解时间的极差最高,甘露醇浓度的极差仅次于酶解时间,说明酶解时间对于原生质体活力的影响最大,维持溶液渗透压的甘露醇浓度对于原生质体制备活力也存在十分显著的影响。

对各组正交实验条件下原生质体分离的产量以及活力数据进行分析,第5组的原生质体产量最高,达到每100 mg真叶1.21×10^6个,第6组和第9组产量也较高,分别为每100 mg真叶6.99×10^5个和6.97×10^5个,以上3组实验条件制备的原生质体形态呈饱满的球状,叶绿体清晰可见,且数量能满足后续实验要求。但第6组和第9组所得的原生质体活力较第5组低,可能由于酶解时间的延长或纤维素酶浓度过高对原生质体细胞产生了损伤。第2组原

表2 不同条件下获得松叶猪毛菜原生质体的产量及活力的极差分析

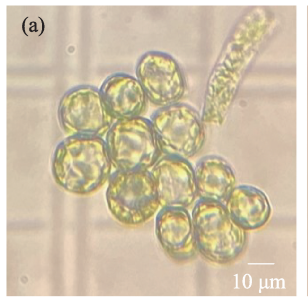
Tab. 2 Protoplast yield and viability of *Salsola laricifolia* under different conditions

编号	纤维素酶浓度	离析酶浓度	甘露醇浓度/(mol·L^{-1})	酶解时间/h	原生质体产量/[个·(100mg)$^{-1}$]	原生质体活力/%
1	1%	0.50%	0.4	2	(1.67±0.05)×10^5	72.7±0.8
2	1%	0.75%	0.5	3	(4.07±0.18)×10^5	85.2±0.9
3	1%	1.00%	0.6	4	(4.83±1.17)×10^5	76.0±1.7
4	2%	1.00%	0.5	4	(4.67±0.13)×10^5	73.3±1.4
5	2%	0.50%	0.6	2	(1.21±1.40)×10^6	85.0±0.4
6	2%	0.75%	0.4	3	(6.97±0.18)×10^5	79.5±1.1
7	3%	1.00%	0.6	3	(5.50±0.50)×10^5	83.0±1.1
8	3%	0.50%	0.4	4	(2.88±0.38)×10^5	74.3±1.8
9	3%	0.75%	0.5	2	(6.99±0.24)×10^5	74.4±1.7
K1	1.06×10^6	1.61×10^6	1.15×10^6	2.08×10^6		
K2	2.38×10^6	1.80×10^6	1.57×10^6	1.65×10^6		
K3	1.54×10^6	1.50×10^6	2.250×10^6	1.23×10^6		
k1	2.34×10^6	2.32×10^6	2.27×10^6	2.32×10^6		
k2	2.38×10^6	2.39×10^6	2.33×10^6	2.48×10^6		
k3	2.32×10^6	2.32×10^6	2.44×10^6	2.24×10^6		
R	4.41×10^5	1.01×10^5	3.66×10^5	2.81×10^5		
K1′	2.34	2.32	2.27	2.32		
K2′	2.38	2.39	2.33	2.48		
K3′	2.32	2.32	2.44	2.24		
k1′	0.78	0.77	0.76	0.77		
k2′	0.79	0.8	0.78	0.83		
k3′	0.77	0.77	0.81	0.75		
R′	0.02	0.02	0.06	0.08		

注：K*x*为对应列水平为*x*时对应原生质体产量的和，k*x*为对应列水平为*x*时对应原生质体产量的平均值，*R*为原生质体产量的极差；K*x*′为对应列水平为*x*时对应原生质体活力的和，k*x*′为对应列水平为*x*时对应原生质体活力的平均值，*R*′为原生质体活力的极差。

生质体活力略高于第5组，但其产量远不及第5组，可能由于纤维素酶含量较低，未能使原生质体充分得以释放。结合酶的用量，酶解时间以及原生质体活力因素，第5组与第6组相比，酶用量少，耗费时间短；第5组与第9组相比，酶用量少，细胞碎片少；第5组与第2组相比，耗费时间短且产量高。因此，纤维素酶浓度为2%、离析酶浓度为0.5%、甘露醇浓度为0.6 mol·L^{-1}为松叶猪毛菜真叶制备原生质体的最佳酶解液组合，2 h为最佳酶解时间。

松叶猪毛菜无菌组培苗真叶原生质体在光学显微镜下呈大小不一的球体，光滑饱满，叶绿体清晰可见的分布于细胞边缘（图2a、图2b）。





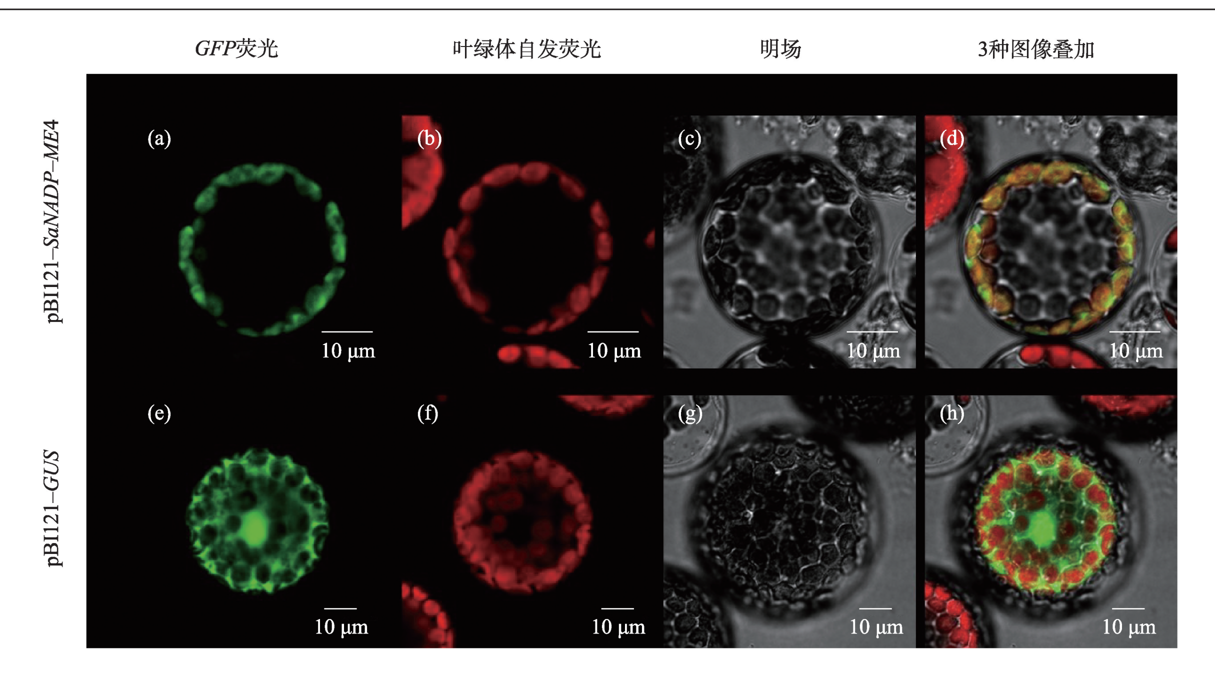
注：图(a)为显微镜(10倍)下的原生质体群；图(b)为显微镜(20倍)下单个原生质体形态。

图2 光学显微镜下松叶猪毛菜无菌组培真叶原生质体形态

Fig. 2 Protoplast morphology of euphylla in aseptic tissue culture of *Salsola laricifolia* microscope

2.3 原生质体的转化研究

以上述最佳条件制备得到的松叶猪毛菜无菌组培苗真叶原生质体作为受体，以植物瞬时表达载体pBI121-*SaNADP-ME4*质粒及pBI121-*GFP*空载质粒（对照）为目标DNA，利用PEG介导法导入原生质体细胞中，室温过夜孵育，在激光共聚焦扫描显微镜下观察GFP蛋白的荧光信号。结果显示，转化2种质粒的原生质体细胞呈透明状，形状规则且没有



注：图(a)、(b)、(c)、(d)依次为：pBI121-*SaNADP-ME4*质粒转化原生质体于*GFP*荧光、叶绿体自发荧光、白光及3个图像叠加图；图(e)、(f)、(g)、(h)依次为：pBI121-*GFP*空载质粒转化原生质体于*GFP*荧光、叶绿体自发荧光、白光及3个图像叠加图。

图3　pBI121-*SaNADP-ME4*转化松叶猪毛菜原生质体的显微观察

Fig. 3　Microscopic observation of *Salsola laricifolia* protoplasts transformed by pBI121-*SaNADP-ME4*

破损(图3)。以蓝光(460~480 nm)作为激发光时，转化pBI121-*SaNADP-ME4*质粒载体的原生质体可在叶绿体内观察到GFP蛋白绿色荧光(图3a、图3b、图3c、图3d)，而空载质粒导入的原生质体只在细胞质中发出绿色荧光，叶绿体内无明显荧光(图3e、图3f、图3g、图3h)。综上所述，空载质粒只在细胞质中表达荧光，而pBI121-*SaNADP-ME4*质粒载体在叶绿体上发出绿色荧光，说明SaNADP-*ME4*定位于叶绿体。

3　讨论

原生质体分离过程中有多种因素会影响原生质体的产量和活力，例如植物材料的选择、材料预处理、酶解液组合、渗透压选择、酶解时间、纯化转速及温度等[6,30-31]。植物材料的选择是成功分离原生质体的基础，通常选择取材较简单且富含组织细胞的叶片，且幼嫩的叶片分离效果较好，并且采用无菌组培苗可免去材料表面消毒的工作，还能减少后续实验染菌的可能[32]，本研究采用25 d苗龄的组培苗叶片作为实验材料。对材料进行预处理会大大提升分离效率，分离高粱(*Sorghum bicolor*)原生质体时，将叶片置于甘露醇溶液中进行质壁分离预处理，有利于维持离体叶片的渗透压，提高分离效率[33]；对拟南芥、烟草进行叶片原生质体分离时，利用胶带去除植物叶下表皮组织，省去了纯化过程，一定程度上提高分离效率[34]；分离沙冬青子叶原生质体时，将叶片切成约1 mm宽的细条，增大了植物材料与酶解液的接触面积，利于达到较高的分离效率[35]。由于松叶猪毛菜的叶片较细小，去除下表皮较为困难，所以采用纵向剖开细小叶片，并置于0.7 mol·L^{-1}甘露醇溶液中进行质壁分离预处理来提高分离产量。

原生质体分离酶解液的组成是分离成功与否的关键因素[16]。纤维素酶可以去除细胞壁主要成分，离析酶是比果胶酶温和的消化细胞骨架中骨胶质成分的酶[36]，2种酶结合使用最为广泛[37]。由于制备原生质体选择的植物材料的细胞壁组成成分存在差异，2种酶浓度配比也不尽相同，如非洲菊叶片原生质体采用2%纤维素酶和0.3%离析酶得到最佳制备产量[12]；多年生黑麦草叶片原生质体采用2%纤维素酶和0.5%离析酶为最优酶解液组合[13]。由于原生质体不具备细胞壁，极易受渗透压的影响而导致质膜受损，酶解液中的渗透压也需要严格控制。最常用的渗透压稳定剂为甘露醇，其特点是不易被细胞吸收利用[38]。酶解液的pH也需要维持于稳定水平，常用MES作为pH稳定剂[39]。制备草莓叶片原生质体时，选择0.9 mol·L^{-1}的甘露醇[40]，分离

葡萄原生质体时，0.6 mol·L^{-1}的甘露醇可以维持渗透压[18]。本实验使用纤维素酶和离析酶进行酶解，甘露醇维持渗透压，MES作为pH稳定剂，所制备的松叶猪毛菜原生质体效果较好。

酶解时间是影响分离效率的又一重要因素，酶解时间过长会导致原生质体质膜受损，导致碎片增多；时间过短，分离的原生质体量太少，无法进行后续实验[13,33]。酶解时间在不同物种中差异很大，一般在3[14]~24 h[41]不等。本研究发现，随着酶解时间的延长，酶量也会随之增加，但会导致细胞碎片增多，分离得到的原生质体活力降低，可能是由于较长时间的酶解，会对原生质体质膜产生一定的损害作用[42]。酶解温度也会影响原生质体分离的产量及活力[40]，采用25 ℃的酶解温度可以充分发挥酶的活性，且不会对原生质体造成损伤作用。在纯化过程中，将原生质体沉降下来的离心步骤也至关重要，过高的离心力会导致原生质体受到机械损伤，过低会导致沉降不彻底[37]，本实验使用的800 rpm·min^{-1}离心力可以得到良好的沉降分离效果。综上所述，本研究采用25 d苗龄的幼苗真叶，纵向剖开后预先质壁分离10 min后，置于2%纤维素酶+0.5%离析酶+0.6 mol·L^{-1}甘露醇的酶解液中25 ℃酶解2 h，得到了较高的原生质体产量和活力，可用于后续实验。

为验证制备的原生质体可用于瞬时转化，本研究以定位于叶绿体的*SaNADP-ME4*作为目标DNA进行原生质体的转化。结果发现，*SaNADP-ME4-GFP*融合蛋白定位于原生质体的叶绿体中，与前人研究该基因定位于拟南芥原生质体叶绿体结果一致[25]，表明本研究建立的原生质体分离和转化方法可以用于松叶猪毛菜的基础研究，为松叶猪毛菜基因功能研究奠定了基础。

4 结 论

本研究以松叶猪毛菜无菌组培苗的真叶为材料，分析不同纤维素酶和离析酶的浓度配比、渗透压及酶解时间对分离原生质体的产量及活力的影响。结论如下：

（1）探究的4个影响因素中：纤维素酶对原生质体制备产量的影响较大，酶解时间对分离的原生质体活力的影响最为显著。

（2）采用25 d叶龄的无菌组培苗真叶，在2%纤维素酶+0.5%离析酶+0.6 mol·L^{-1}甘露醇的酶解液中于25 ℃酶解2 h，使用W5溶液在800 rpm·min^{-1}的转速下纯化，原生质体产量可达1.21×10^6个，活力为85%。

（3）利用制备的松叶猪毛菜原生质体作为受体，用PEG转化法转化pBI121-*SaNADP-ME4-GFP*质粒载体，检测到*SaNADP-ME4*定位于叶绿体中。

参考文献（References）：

[1] Davey M R, Anthony P, Power J B, et al. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives[J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(2): 131–171.

[2] 常胜合, 孙威, 许桂莺, 等. 植物原生质体分离方法及其应用研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(4): 1271–1277. [Chang Shenghe, Sun Wei, Xu Guiying, et al. Isolating method of plant protoplast and its research advances of application[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(4): 1271–1277.]

[3] Marion J, Bach L, Bellec Y, et al. Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of Arabidopsis seedlings[J]. Plant Journal, 2008, 56(1): 169–179.

[4] Ren R, Gao J, Lu C Q, et al. Highly efficient protoplast isolation and transient expression system for functional characterization of flowering related genes in cymbidium orchids[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 2264.

[5] Gorska A M, Gouveia P, Borba A R, et al. ZmOrphan94 transcription factor downregulates ZmPEPC1 gene expression in maize bundle sheath cells[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 559–567.

[6] 王飞, 钟雄辉, 陈登辉, 等. 甘蓝原生质体制备体系优化及瞬时转化体系的建立[J]. 华北农学报, 2020, 35(3): 69–78. [Wang Fei, Zhong Xionghui, Chen Denghui, et al. Optimization of protoplasts preparation system and establishment of ttransient transformation system in *Brassica oleracea* var. *capitata* L.[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2020, 35(3): 69–78.]

[7] Pasternak T, Paponov I A, Kondratenko A, et al. Optimizing protocols for arabidopsis shoot and root protoplast cultivation[J]. Plants-Basel, 2021, 10(2): 375.

[8] Jeong Y Y, Lee H Y, Kim S W, et al. Optimization of protoplast regeneration in the model plant Arabidopsis thaliana[J]. Plant Methods, 2021, 17(1): 21.

[9] 尚飞, 李咪咪, 李莉, 等. 烟草原生质体的制备和分析[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2013, 41(3): 130–137. [Shang Fei, Li Mimi, Li Li, et al. Preparation and alalysis of tobacco protoplasts [J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2013, 41(3): 130–137.]

[10] 聂琼, 刘仁祥, 徐如宏. 烟草原生质体分离纯化条件的优化[J].

贵州农业科学, 2012, 40(9): 20-23. [Nie Qiong, Liu Renxiang, Xu Ruhong. Optimization of isolation and purification of tobacco protoplast[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2012, 40(9): 20-23.]

[11] Zhang Y, Su J, Duan S, et al. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes[J]. Plant Methods, 2011, 30(7):1746-1748.

[12] 宋爱华, 张文斌, 孙姝兰, 等. 非洲菊原生质体制备及瞬时转化系统的建立[J]. 植物学报, 2017, 52(4): 511-519. [Song Aihua, Zhang Wenbin, Sun Shulan, et al. Preparation of protoplast and establishment of transient expression system in grebera hybrida[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2017, 52(4): 511-519.]

[13] 姜倩倩, 陈磊, 李正男, 等. 多年生黑麦草原生质体制备及瞬时表达体系的建立[J]. 分子植物育种, 2021, 19(9): 2941-2948. [Jiang Qianqian, Chen Lei, Li Zhengnan, et al. Protoplast isolation and establishment of gene transient expression system in *Lolium perenne* L.[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(9): 2941-2948.]

[14] 仝亚楠, 刘雪, 刘秀洁, 等. 苋菜原生质体和瞬时转化体系的建立及应用[J]. 分子植物育种, 2021, 19(19): 6476-6481. [Tong Yanan, Liu Xue, Liu Xiujie, et al. Establishment and application of protoplast and transient transformation system of *Edible amaranth* (*Amaranthus* spp.)[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19 (19): 6476-6481.]

[15] Xu X F, Zhu H Y, Ren Y F, et al. Efficient isolation and purification of tissue-specific protoplasts from tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)[J]. Plant Methods, 2021, 17(1): 84.

[16] 李青, 鱼海鹏, 张子豪, 等. 棉花真叶肉原生质体分离及瞬时表达体系的优化[J]. 中国农业科学, 2021, 54(21): 4514-4524. [Li Qing, Yu Haipeng, Zhang Zihao, et al. Optimization of cotton mesophyll protoplast transient expression system[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(21): 4514-4524.]

[17] 王一菲, 刘新星, 张青, 等. 油棕叶肉原生质体分离及瞬时转化体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(1): 154-159. [Wang Yifei, Liu Xinxing, Zhang Qing, et al. Isolation of oil palm mesophyll protoplasts and establishment of transient transformation system[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(1): 154-159.]

[18] 舒小娟, 温腾建, 邢佳毅, 等. 葡萄原生质体分离及瞬时转化体系的建立[J]. 西北植物学报, 2015, 35(6): 1262-1268. [Shu Xiaojuan, Wen Tengjian, Xing Jiayi, et al. Isolation of protoplast and establishment of transient transformation system in Grapevine(*Vitisv inifera* L.)[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(6): 1262-1268.]

[19] Yao L P, Liao X, Gan Z Z, et al. Protoplast isolation and development of a transient expression system for sweet cherry (*Prunus avium* L.)[J]. Scientia Horticulturae, 2016, 209: 14-21.

[20] Marion J, Bach L,Bellec Y, et al. Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of arabidopsis seedlings[J]. Plant Journal, 2008, 56(1): 169-179.

[21] Wang J J, Wang Y, Wang Y Z, et al. An efficient and universal protoplast isolation protocol suitable for transient gene expression analysis and single-cell RNA sequencing[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(7): 3419.

[22] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志（第二卷）: 第一分册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1994: 86-91. [Editorial Committee of Xinjiang Flora. Flora of Xinjiang (Volume II): Fascicle I [M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Health Publishing House, 1994: 86-91.]

[23] Voznesenskaya E V, Koteyeva N K, Akhani H, et al. Structural and physiological analyses in Salsoleae (Chenopodiaceae) indicate multiple transitions among C_3, intermediate, and C_4 photosynthesis [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(12): 3583-3604.

[24] Wen Z B, Zhang M L. *Salsola laricifolia*, another C_3-C_4 intermediate species in tribe Salsoleae s.l. (Chenopodiaceae)[J]. Photosynthesis Research, 2015, 123(1): 33-43.

[25] Christin P A, Sage T L, Edwards E J, et al. Complex evolutionary transitions and the significance of C_3-C_4 intermediate forms of photosynthesis in molluginaceae[J]. Evolution, 2011, 65(3): 643-660.

[26] Sage R F, Khoshravesh R, Sage T L. From proto-kranz to C_4 kranz: building the bridge to C_4 photosynthesis[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(13): 3341-3356.

[27] Wen Z B, Wang Y L, Xia C L, et al. Chloroplastic *SaNADP-ME*4 of C_3-C_4 woody desert species *Salsola laricifolia* confers drought and salt stress resisance to *Arabidopsis*[J]. Plants-Basel, 2021, 10 (9): 1827.

[28] 陈鹏. 小议血球计数板的使用[J]. 中学生物学, 2009, 25(8): 58-59. [Chen Peng. Discussion on the use of blood cell counting chamber[J]. Middle School Biology, 2009, 25(8): 58-59.]

[29] Wu F Q, Hanzawa Y. A simple method for isolation of soybean protoplasts and application to transient gene expression analyses[J]. Jove-Journal of Visualized Experiments, 2018, 131: 57258.

[30] 赵苏州, 卢运明, 张占路, 等. 玉米和拟南芥的原生质体制备及瞬时表达体系的研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(12): 3479-3482. [Zhao Suzhou, Lu Yunming, Zhang Zhanlu, et al. Protoplast preparation and transient expression system in maize and *Arabidopsis*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(12): 3479-3482.]

[31] 沈雁翔, 梁言, 王鹏, 等. 舞春花原生质体分离条件的优化研究[J]. 上海农业科技, 2022(2): 15-18. [Shen Yanxiang, Liang Yan, Wang Peng, et al. Study on the optimization of protoplast separation conditions of *Calibrachoa hybrida*[J]. Shanghai Agricultural Science and Technology, 2022(2): 15-18.]

[32] 陈名红, 熊立, 陈学军. 烟草叶肉原生质体分离和纯化研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2005, 24(4): 326-329. [Chen Minghong, Xiong Li, Chen Xuejun. Isolation and purification of mesophyll protoplast in tabacco[J]. Journal of Yunnan Minzu University(Natural Sciences Edition), 2005, 24(4): 326-329.]

[33] 谢鑫, 蒋君梅, 王勇, 等. 高粱原生质体的制备及转化方法研究[J]. 种子, 2019, 38(8): 43-46. [Xie Xin, Jiang Junmei, Wang Yong, et al. Study on the method of protoplast isolation and transformation of Sorghumbicolor[J]. Seed, 2019, 38(8): 43-46.]

[34] 赖叶林, 贺莹, 李欣欣, 等. 一种植物原生质体分离与瞬时转化的方法[J]. 植物生理学报, 2020, 56(4): 895-903. [Lai Yelin, He

Ying, Li Xinxin, et al. An approach to isolation and transient transformation of protoplasts in plants[J]. Plant Physiology Journal, 2020, 56(4): 895-903.]

[35] 楠迪娜, 薛敏, 唐宽刚, 等. 沙冬青子叶原生质体瞬时表达体系的建立及其AmDREB1蛋白的亚细胞定位[J]. 植物科学学报, 2018, 36(4): 562-568. [Nan Dina, Xue Min, Tang Kuangang, et al. Establishment of the cotyledon protoplast transient expression system of *Ammopiptanthus mongolicus* and subcellular localization of the AmDREB1 protein[J]. Plant Science Journal, 2018, 36(4): 562-568.]

[36] 谷战英, 杨若楠, 陈昊. 油桐叶肉细胞原生质体分离及瞬时转化体系的建立[J]. 林业科学, 2018, 54(1): 46-53. [Gu Zhanying, Yang Ruonan, Chen Hao. The establishment of isolation and transient transformation methods of protoplass of *Vernicia fordii* mesophyll cells[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2018, 54(1): 46-53.]

[37] 李婧瑶, 刘龙飚, 丁兵, 等. 植物原生质体分离及培养研究进展[J]. 分子植物育种, 2021, 21(2): 620-632. [Li Jingyao, Liu Longbiao, Ding Bing, et al. Research progress on isolation and culture of plant protoplasts[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 21(2): 620-632.]

[38] Zhou J, Wang B C, Zhu L Q. Conditioned culture for protoplasts isolated from chrysanthemum: An efficient approach[J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2005, 45(3-4): 113-119.

[39] 周波, 聂玉哲, 张晓磊, 等. 芜菁原生质体的分离及绿色荧光蛋白的瞬时表达[J]. 生物技术通讯, 2008(4): 542-544. [Zhou Bo, Nie Yuzhe, Zhang Xiaolei, et al. Protoplast isolation of brassica rapa 'tsuda' turnip and transient expression of green fluor escent protein[J]. Letters in Biotechnology, 2008(4): 542-544.]

[40] 杜小云, 王震, 王翠华, 等. "红颜"草莓原生质体制备及瞬时转化体系的建立[J]. 生物资源, 2019, 41(6): 532-538. [Du Xiaoyun, Wang Zhen, Wang Cuihua, et al. Preparation of protoplasts and establishment of transient transformation system of Hongyan strawberry[J]. Biotic Resources, 2019, 41(6): 532-538.]

[41] Chamani E, Tahami S K, Zare N, et al. Effect of different cellulase and pectinase enzyme treatments on protoplast isolation and viability in lilium ledebeourii bioss[J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2012, 40(2): 123-128.

[42] 雷海英, 白凤麟, 冯宇, 等. 玉米叶片原生质体的制备及瞬时转化体系的建立[J]. 长治学院学报, 2018, 35(2): 11-14. [Lei Haiying, Bai Fenglin, Feng Yu, et al. Preparation of maize leaf protopasts and establishment of transient transformation system[J]. Journal of Changzhi University, 2018, 35(2): 11-14.]

Preparation and optimization of leaf protoplasts of *Salsola laricifolia*

XI Yuxin[1,2,3], ZHANG Yuhui[1,3,4], WEN Zhibin[1,2,4,5]

(1. State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academyof Sciences, Urumqi 830011, Xinjiang, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of Stress to Tolerance Plant Resources Conservation and Resistance Gene Utilization, Urumqi 830011, Xinjiang, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Sino-Tajikistan Joint Laboratory for Conservation and Utilization of Biological Resources, Urumqi 830011, Xinjiang, China; 5. The Specimen Museum of Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, Xinjiang, China)

Abstract: The release of high-quality protoplasts from plant tissues is a prerequisite for the establishment of other technical systems such as protein subcellular localization, transient expression analysis, and protein-protein interactions. To quickly explore the special functional genes of the C_3-C_4 intermediate plant *Salsola laricifolia*, it is essential to establish a simple and efficient method for preparing leaf protoplasts. In this study, the euphylla of axenic tissue culture seedlings of *S. laricifolia* was used as material to analyze the effects of different concentration ratios of cellulase and isolated enzymes and osmotic pressure on protoplast isolation. The results showed that the true leaves of sterile tissue culture seedlings with a seedling age of 25 days were used for enzymatic hydrolysis in enzymatic hydrolysis solution of 2% cellulase + 0.5% isolated enzyme R-10 + 0.6 mol·L^{-1} mannitol at 25 °C for 2 h, and W5 The solution was purified at a speed of 800 rpm·min^{-1}, the yield of protoplasts could reach 1.21×10^6, and the viability was 85%. Using the obtained protoplast of *S. laricifolia* as a receptor, the pBI121-*SaNADP-ME*4-*GFP* plasmid vector was successfully transformed by the PEG transformation method, and it was detected that *SaNADP-ME*4 was located in the chloroplast. In this study, an efficient system for preparing protoplasts from the leaves of *S. laricifolia* was established, which lays the foundation for mining the special gene functions of this species.

Keywords: *Salsola laricifolia*; leaf; protoplast; C_3-C_4 intermediate plant